

P23973.P04

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Tae-Won KANG et al.

Serial No. : Not Yet Assigned

Filed : Concurrently Herewith

For : PURIFICATION METHOD FOR TEICOPLANIN A2


CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Korean Application No. 10-2002-0042425, filed July 19, 2002. As required by 37 C.F.R. 1.55, a certified copy of the Korean application is being submitted herewith.

Respectfully submitted,
Tae-Won KANG et al.


Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027

Reg. No.
33,329

July 18, 2003
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1950 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191



대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

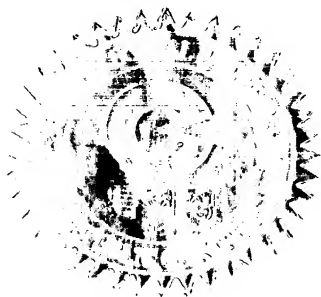
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0042425
Application Number

출원년월일 : 2002년 07월 19일
Date of Application JUL 19, 2002

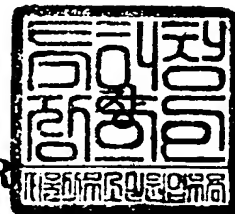
출원인 : 종근당바이오 주식회사
Applicant(s) CKD Bio Corp



2003 년 06 월 25 일

특 허 청

COMMISSIONER





【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.07.19
【발명의 명칭】	테이코플라닌 에이 투 정제 방법
【발명의 영문명칭】	Purification method for teicoplanin A2
【출원인】	
【명칭】	종근당바이오 주식회사
【출원인코드】	1-2002-005467-2
【대리인】	
【성명】	박승문
【대리인코드】	9-1999-000536-0
【포괄위임등록번호】	2002-053254-8
【대리인】	
【성명】	조용식
【대리인코드】	9-1999-000634-5
【포괄위임등록번호】	2002-053255-5
【대리인】	
【성명】	안소영
【대리인코드】	9-2000-000155-5
【포괄위임등록번호】	2002-053258-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	강태원
【성명의 영문표기】	KANG, Tae Won
【주민등록번호】	530718-1531612
【우편번호】	139-932
【주소】	서울특별시 노원구 중계동 578 현대아파트 113-702
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최병택
【성명의 영문표기】	CHOI, Byoung Taek
【주민등록번호】	540505-1228423



1020020042425

출력 일자: 2003/6/25

【우편번호】	130-859
【주소】	서울특별시 동대문구 전농1동 647-41 한양빌라 나동 204동
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최강선
【성명의 영문표기】	CHOI, Gang Sun
【주민등록번호】	591113-1249410
【우편번호】	442-736
【주소】	경기도 수원시 팔달구 영통동 살구골 동아아파트 717동 1603호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최용락
【성명의 영문표기】	CHOI, Yong Rack
【주민등록번호】	700624-1238810
【우편번호】	429-746
【주소】	경기도 시흥시 정왕동 1786 두산아파트 114동 405호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	황성호
【성명의 영문표기】	HWANG, Sung Ho
【주민등록번호】	740505-1046920
【우편번호】	407-800
【주소】	인천광역시 계양구 계산3동 59-1
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 박승문 (인) 대리인 조용식 (인) 대리인 안소영 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	7 면 7,000 원



1020020042425

출력 일자: 2003/6/25

【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	21	항	781,000	원
【합계】	817,000			원
【첨부서류】	1.	요약서·명세서(도면)_1통		

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 테이코플라닌 A₂ 정제 방법에 관한 것으로, 여과된 균배양 발효액을 합성흡착제로 정제하는 1차 예비정제단계, 상기 1차 예비정제액을 고가교도를 지닌 양이온 교환수지, 카탈리틱 수지 또는 킬레이트 수지로 정제하는 2차 예비정제단계, 상기 2차 예비정제액을 역상 수지로 정제하는 최종정제단계 및 분말화단계로 이루어짐을 특징으로 한다.

본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법은 다량의 유기용매를 사용하지 않고, 공정이 간단하며, 고순도의 테이코플라닌 A₂를 수득할 수 있다.



【명세서】

【발명의 명칭】

테이코플라닌 에이 투 정제 방법 {Purification method for teicoplanin A₂}

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <1> 본 발명은 글라이코펩타이드계 항생제인 테이코플라닌 A₂(teicoplanin A₂)의 정제 방법에 관한 것이다.
- <2> 글라이코펩타이드계 항생제는 최근 심각한 문제로 대두되고 있는 수퍼박테리아에 대해 우수한 활성을 나타내는 물질로, 병원성 그람양성세균의 세포벽 합성을 저해함으로써 이들 세균의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다. 그 중에서도 테이코플라닌 A₂는 특히 약효가 우수하면서도 독성이 적고 반감기가 길기 때문에, 그 수요가 증가하고 있다.
- <3> 테이코플라닌 A₂의 생산은 화학적인 방법으로는 그 합성이 매우 어렵기 때문에, 주로 발효에 의한 정제에 의존하고 있다. 테이코플라닌 생산에 사용되어 온 대표적 균주는 액티노플라네스 테이코마이세티커스(*Actinoplanes teichomyceticus*) ATCC 31121 균주이다(J. Antibiotics, 276-283, 1978). 상기 균주는 발효과정에 의해 테이코플라닌 A₁, 테이코플라닌 A₂ 및 테이코플라닌 A₃를 비롯하여, A8327 인자 B와 A8327 인자 C를 생산한다. 따라서, 상기 균주의 발효액으로부터 테이코플라닌 A₂를 선택적으로 정제할 수 있는 방법이 계속하여 개발되어 왔다.



- <4> 미국 특허 제 4239751호에서는 발효 배양액을 여과한 후, pH 3.5에서 수난용성 (water-insoluble) 유기용매와 혼합하여 항생물질 혼합물이 용해되도록 하고, 두 번의 추출과정 후 농축하여 저온에서 항생물질 혼합물의 침전이 생성될 때까지 방치한 후, 이 침전물을 여과시켜 회수한다. 그리고 균사체에 잔류하는 항생물질을 마저 회수하기 위해 수용성 아세톤으로 추출하는 단계를 실행한다. 이렇게 회수한 침전물에는 세 종류의 테이코플라닌 외에 A8327 인자들이 모두 존재하므로, 용매시스템을 이용하여 A8327 인자들을 제거하고, 세파텍스 LH-20 크로마토그래피를 수행하여 테이코플라닌 A₂를 특이적으로 분리한다.
- <5> 상기 방법은 고순도의 테이코플라닌 A₂를 얻을 수 있긴 하나, 여러 단계에 걸친 유기용매 사용으로 인해 최종 회수물에 이들 유기용매가 축적된다는 점과, 세파텍스 LH-20 와 같은 고가의 분리수지를 사용해야 테이코플라닌 A₂를 얻을 수 있다는 점에서 환경오염의 우려 및 경제적 부담이 크다.
- <6> 미국특허 제 4542018호에서는 상기 방법으로 얻는 테이코플라닌 A₂에 대해 역상수지 크로마토그래피를 수행하여, 테이코플라닌 A₂의 순수한 단일 인자 테이코플라닌 A₂-1, 2, 3, 4 및 5를 분리하는 방법이 제공되고 있다.
- <7> 이 방법에서는 입자 크기가 매우 작은 고가의 역상수지를 사용하기 때문에, 테이코플라닌 A₂의 대량 생산을 위한 산업적 목적에는 사용하기 어려우며, 미국특허 제 4239751호에서 나타난 문제점을 여전히 갖고 있다.
- <8> 한편 미국특허 제 4696817호에서는 발효배양액을 여과하지 않고 아세토나이트릴, 아세톤, 프로판올, 메틸에틸케톤 등의 수혼화성 용매와 혼합한 후, 배양액으로부터 테이코플라닌 A



$_2$ 를 분리하고 농축하여, 침전물이 생성될때까지 저온에서 방치한 후, 침전물을 여과하여 회수하는 방법으로 상기 미국특허 제 4239751호에 비해 한 단계가 줄어들어 공정이 간단하다.

<9> 그러나 상기 방법은 군사체와 발효액을 분리하기 위한 목적으로 여과공정 대신 과량의 용매를 사용하기 때문에 용매 축적의 문제점을 그대로 안고 있으며, 소모된 용매 혼합물의 회수 및 분리에 많은 비용이 소모되는 단점이 있다.

<10> 유럽특허 제 0479086호에서는 테이코플라닌 A₂의 추출 수율을 높이기 위해, 두 차례의 여과과정 전에 발효배양액의 pH를 조절한다. 여과액을 폴리아마이드 수지에 걸여 용출액을 얻은 후, 다시 과량의 아세톤을 이용하여 추출하고, 3시간 동안 방치한 후 상등액 부분의 아세톤은 제거하고 여과하여 얻은 케익을 다시 아세톤으로 세척한 후, 테이코플라닌 A₂를 회수하는 방법을 사용하였다.

<11> 상기 방법을 사용하면 74.3%의 회수율로 HPLC 순도 85%의 테이코플라닌 A₂를 얻을 수 있으나, 이러한 순도는 의약품으로 사용되기에는 낮은 수준이다. 또한 여러 단계에서 과량의 아세톤 용매를 사용한다는 점에서, 기존의 용매 축적 문제는 여전히 남아 있다.

<12> 미국특허 제 4845194호에서는 발효배양액에 가교도가 2% 이하인 양이온교환수지를 첨가하여 테이코플라닌을 흡착시킨 후, 100 메쉬 체를 사용하여 수지와 군사체를 분리하였다. 이후 수지를 증류수 세척 후 용출하여 테이코플라닌을 회수하였다.

<13> 이 방법에서 여과에 사용하는 가교도 2% 이하의 양이온교환수지는 내산화성, 체적변화율, 교환용량이 저하된다는 화학적 단점과, 쉽게 파쇄되어 수지 수명이 단축되는 물



리적 단점을 갖고 있어, 수지의 잦은 교환으로 인해 경제적으로 많은 비용이 소모되는 단점이 있다.

- <14> 대한민국 특허공고 제 2000-0066479호에서는 발효배양액을 pH 11로 조절한 후, XAD-16, HP-20, 활성탄 또는 실리카겔 등의 중성수지에 상기 발효배양액의 원심분리로 얻은 상등액을 흡착시킨 후, 50~80%의 메탄올 용액으로 용출시켜 감압증류함으로써 조분말 상태의 테이코플라닌 A₂를 회수한다. 회수한 테이코플라닌 A₂를 아세트산나트륨 용액에 용해시킨 후, 당친화성 크로마토그래피 방법으로 분리하여 정제한다.
- <15> 이 방법에서는 중성수지로부터 용출한 후 메탄올 용액을 제거하기 위한 완전 감압 증류 단계에서 테이코플라닌 A₂의 안정성에 문제가 생길 수 있으며, 고가의 수지와 용출제를 사용하기 때문에 대량 생산에 적용하기에는 바람직하지 않다.
- <16> 따라서, 다량의 유기용매나 고가의 수지를 사용하지 않고 고순도의 테이코플라닌 A₂를 대량으로 생산하는데 적용될 수 있는 방법에 대한 발명은 여전히 해결되어야 할 과제로 남아있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <17> 상기 과제를 달성하기 위해, 본 발명에서는 다량의 유기용매를 사용하지 않고, 간단한 공정에 의해 고순도의 테이코플라닌 A₂를 수득할 수 있는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법을 제공하고자 한다.

【발명의 구성 및 작용】

- <18> 본 발명은 고순도의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법을 제공한다.

- <19> 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법은 여과된 균배양 발효액을 합성흡착제로 정제하는 1차 예비정제단계, 상기 1차 예비정제액을 고가교도를 지닌 양이온교환수지, 카탈리틱 수지 또는 킬레이트 수지로 정제하는 2차 예비정제단계, 상기 2차 예비정제액을 역상 수지로 정제하는 최종정제단계 및 분말화단계로 이루어짐을 특징으로 한다.
- <20> 이하 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법의 각 단계에 대해 상세히 설명한다.
- <21> 우선 테이코플라닌 A₂를 생산할 수 있는 균을 배양하여 발효시킨다. 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법에서는 테이코플라닌 A₂ 생산균으로 액티노플라네스 테이코마이세티커스 ATCC 31121 균주를 사용하는 것이 바람직하다.
- <22> 1차 예비정제단계에서는 여과된 균배양 발효액의 pH를 조절한 후, 합성흡착제에 도입한다. 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법에서는 합성흡착제에 대한 테이코플라닌 A₂의 정제 효율을 높이기 위해 여과액의 pH를 pH 4~9의 범위로 조절하며, 바람직하게는 pH 5~7의 범위로 조절한다.
- <23> 합성흡착제는 교환기가 없는 고분자 중합체로, 다공성이 뛰어나고 세공 비표면적이 크므로, 테이코플라닌을 비롯하여 분자량이 큰 유기물질을 우수하게 흡착할 수 있으며, 여과액 중의 착색물질을 제거할 수 있다.
- <24> 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법에서 사용가능한 합성흡착제는 고다공성 스티렌계 합성흡착제, 고다공성 스티렌계에 브롬을 화학적으로 조성시킨 합성흡착제, 고다공성 스티렌/다이비닐 중합체, 거대그물모양이 가교화된 중합체, 거대 그물모양이 가교화된 지방족 중합체, 거대그물모양이 가교화된 방향족 중합체, 메타크릴계를 기재로 하는

합성흡착제 및 고다공성 스티렌/다이비닐벤젠 이온교환수지를 기재로 하는 탄소(질)의 합성흡착제 등이 있다.

<25> 구체적으로는, 시판되고 있는 합성흡착제 중 DIAION SP207, DIAION SP700, DIAION SP825, DIAION SP850, DIAION HP2MG(Mitsubishi Chemical co.), AMBERLITE XAD 4, AMBERLITE XAD 7, AMBERLITE XAD 1600T, AMBERSORB 563, AMBERSORB 572, AMBERSORB 600(ROHM and HAAS co.), Lewatit VP OC 1064, Lewatit VP OC 1066, Lewatit EP 63(Bayer co.) 등이 있다.

<26> 상기 합성흡착제 중 선택된 하나를 컬럼에 충전한 후 여과액을 정제하고, 증류수로 컬럼을 세척한 후, 적절한 pH를 지닌 용출액을 사용하여 컬럼에 흡착된 테이코플라닌을 용출시킨다.

<27> 테이코플라닌의 정제 효율을 결정하는 것은 용출액의 pH로, 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법에서 1차 예비정제단계의 용출액은 pH 10~13의 증류수를 사용하며, 바람직하게는 pH 10.5~12의 증류수를 사용한다. 또한 용출액으로 아세톤이 함유된 증류수를 사용할 수도 있으며, 바람직하게는 50~80%의 농도로 아세톤이 함유된 증류수를 사용한다. 상기와 같은 pH 범위에서는 다른 유기물질들은 합성흡착제에 흡착된 채로 남고, 테이코플라닌만이 특이적으로 용출액 내로 분리될 수 있어서, 이후의 정제 과정이 용이하게 이루어질 수 있다.

<28> 이후 2차 예비정제단계에서는 상기 1차 예비정제액에 대해 고가교도를 지닌 양이온 교환수지, 카탈리틱 수지 또는 킬레이트 수지 크로마토그래피를 수행한다.

- <29> 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법에서 양이온교환수지, 카탈리틱 수지 또는 킬레이트 수지는 8% 이상의 가교도를 갖는 것을 사용하며, 고다공성 폴리스티렌/다이비닐 중합체를 기질로 하며 술포네이트 또는 이미노아세테이트를 교환기로 갖는 겔 또는 포로스 타입을 사용하는 것이 바람직하다.
- <30> 구체적으로는 시판되는 수지 중 DIAION SK1B, DIAION PK216, DIAION CR11, DIAION CR20, DIAION UBK555(Mitsubishi Chemical co.), TRILITE SPC 160H, TRILITE SPC 180H, TRILITE SPC 400LH(Samyang co.), AMBERLITE 200C Na, AMBERLITE CG50, AMBERLITE CR1310 Na, AMBERJET 200H, AMBERLYST 131 WET, AMBERLYST 232 WET(ROHM and HAAS co.), Lewatit VP OC 1800, Lewatit VP OC 1812, Lewatit MDS1368 Na, Lewatit K1221(Bayer co.), PUROLITE PCR833CA, PUROLITE C145(Purolite co.), MFG 210, MFG 250(Finex co.) 등이 있다.
- <31> 상기 수지 중 선택된 하나를 컬럼에 충전한 후 여과액을 정제한다. 이때 테이코플라닌을 수지에 최대한 흡착시키기 위한 중요한 요인은 수지 재생시의 pH 조절이다. 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법에서는 수지 재생시 가성소다 세척 후 초산 또는 묽은 염산 등의 약산에 의한 세척을 순서대로 수행하여, 컬럼을 증류수로 세척하였을 때 최종 용출액의 pH가 4.5~7.0이 되도록 한다.
- <32> 컬럼에 여과액을 걸어준 후, 증류수로 컬럼을 세척하고 적절한 pH를 지닌 용출액을 사용하여 컬럼에 흡착된 테이코플라닌을 용출시킨다. 이때 테이코플라닌 용출의 효율을 결정하는 것은 pH이다. 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법에서 2차 예비정제단계의 용출액은 pH 10~13의 증류수를 사용하며, 바람직하게는 pH 10.5~12의 증류수를 사용한다.

- <33> 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법에서는 상기와 같이 예비정제단계를 모두 거치게 되면, 배양여과액에 존재하던 대부분의 착색물질을 비롯하여 이후의 역상수지 크로마토그래피에 영향을 주는 유기용매 등의 이물질 또한 제거되어, HPLC 순도 40% 이상의 테이코플라닌 예비정제액을 얻을 수 있다.
- <34> 이처럼 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법에서는 예비정제액의 순도가 일정 수준 이상으로 높기 때문에, 이후의 최종정제단계에서 테이코플라닌의 수지 흡착이 이물질의 방해없이 용이하게 이루어질 수 있다.
- <35> 예비정제단계 후, 테이코플라닌 예비정제액은 별도의 pH 조절 없이 역상 수지에 의한 최종정제단계를 거친다.
- <36> 역상 수지는 실리카를 기질로 하여 탄소수 1~18 개를 지닌 비극성 측쇄기(side chain group)를 도입한 것으로, 입자크기가 15~150 μ m인 것을 사용한다. 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법에서는 시판 중인 SK-GEL ODS S-15/30(Soken co.), FLASH KP-C18-HS(Biotage co.), DAISOGEL 3001A(Daiso co.) 및 DMS DM 1020(Shiseido co.) 등을 사용하는 것이 바람직하다.
- <37> 상기 수지 중 선택된 하나를 카트리지 등으로 분취되는 HPLC 컬럼에 충전하여 테이코플라닌 예비정제액을 정제한 후 증류수로 컬럼을 세척하고, 수성 용매 혼합물을 용출액으로 이용하여 수지에 흡착된 테이코플라닌을 용출시킨다. 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법에서는 용출액으로 유기용매가 함유된 증류수를 사용하며, 바람직하게는 20~30%의 농도로 유기용매가 함유된 증류수를 사용한다. 구체적으로는 23~27%의 아세톤 또는 아세토니트릴이 함유된 증류수를 사용한다.

- <38> 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법에서는 상기와 같이 최종정제단계까지 거치면, 95% 이상의 고순도를 지니는 테이코플라닌 A₂ 정제액을 얻을 수 있다. 상기 정제액에는 테이코플라닌 A₂와 주요 유사물질인 테이코플라닌 A₃가 3% 이하로만 존재하고 있어, 그 순도가 매우 높다.
- <39> 이후 분말화단계에서는, 상기 최종정제액을 예비 정제 단계에서 사용된 합성흡착제 또는 최종정제단계에서 사용된 역상수지에 흡착시킨다. 흡착 방법 및 조건은 상기 예비 정제단계 및 최종정제단계의 방법 및 조건과 동일하다.
- <40> 용출액으로 50~80%의 아세톤 또는 아세토니트릴이 함유된 증류수를 사용하여 수지에 흡착된 테이코플라닌을 용출시킨다. 상기 용출액을 진공 하에서 농축하여 유기용매를 제거한 후 동결 건조하면, 분말 형태의 고순도 테이코플라닌 A₂를 얻게 된다.
- <41> 이처럼 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법에서는 유기용매를 이용한 추출공정을 합성흡착제 및 수지에 의한 정제단계로 대체함으로써, 잔류유기용매에 의한 테이코플라닌 A₂의 품질 저하 등의 저효율 현상을 비롯하여, 환경 오염 및 처리비용 증가 등의 경제적 소모를 방지할 수 있다.
- <42> 또한 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법은 기존의 정제 방법에 비해 비교적 간단한 공정만으로도 훨씬 높은 순도의 테이코플라닌 A₂를 수득할 수 있게 한다.
- <43> 따라서 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법은 테이코플라닌 A₂를 산업적으로 대량 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- <44> 이하, 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법을 실시예를 통해 보다 상세히 설명하되, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 의해 국한되는 것은 아니다.

- <45> [실시예 1] 합성흡착제 AMBERLITE XAD 1600T와 킬레이트 수지 AMBERLYST 232 WET를 이용한 테이코플라닌 A₂의 예비정제
- <46> 합성흡착제 AMBERLITE XAD 1600T와 킬레이트 수지 AMBERLYST 232 WET를 이용하여 테이코플라닌 A₂를 예비정제하였다.
- <47> 테이코플라닌을 정제할 시료로 약 0.9g의 테이코플라닌 A₂가 함유된 pH 7의 배양여과액 1ℓ를 준비하였다.
- <48> 1차 예비정제단계를 위해, 직경 4cm, 길이 12cm의 크로마토그래피 컬럼에 합성흡착제 AMBERLITE XAD 1600T(ROHM and HAAS co.) 150ml를 충전시키고, 상기 여과배양액을 2.5ml/min의 유속으로 컬럼에 걸어주었다.
- <49> 실온에서 증류수를 사용하여 컬럼을 세척한 후, 가성소다를 사용하여 pH 12로 조절된 증류수를 사용하여 용출시켰다. 상기 과정에서 사용된 컬럼은 1M 가성소다용액 200ml를 사용하여 재생시키고 이어 증류수 400ml로 세척하였다.
- <50> 상기 과정에 의해 얻은 1차 정제액에 대해 HPLC를 수행하여 그 순도를 측정한 결과, 0.8g의 테이코플라닌 A₂가 함유된 HPLC 순도 27%의 정제액을 얻을 수 있었다.
- <51> 2차 예비정제를 위해, 상기 테이코플라닌 1차 정제액에 대해 약 0.5g의 테이코플라닌 A₂가 50ml의 용액에 함유되도록 시료액을 준비하였다.
- <52> 직경 4cm, 길이 12cm의 크로마토그래피 컬럼에 킬레이트 수지 AMBERLYST 232 WET(ROHM and HAAS co.) 100ml를 충전시켰다. 상기 컬럼을 가성소다로 세척한 후 초산으

로 다시 한번 세척하여 수지를 평형시키고, 증류수로 세척하여 얻는 용출액의 pH가 6.45임을 확인하였다.

<53> 상기 시료액을 1.6ml/min의 유속으로 컬럼에 걸어 주었다. 실온에서 증류수로 세척한 후, 가성소다로 pH 12가 되도록 조절된 증류수를 사용하여 용출시켰다. 상기 과정에서 사용된 컬럼은 1M 가성소다용액 150ml를 사용하여 재생시키고 이어 증류수 100ml로 세척한 후, 1M 초산용액 150ml으로 세척하고 다시 증류수 200ml로 세척하였다.

<54> 상기 과정에 의해 얻은 2차 예비정제액에 대해 HPLC를 수행하여 그 순도를 측정한 결과, 0.46g의 테이코플라닌 A₂가 함유된 HPLC 순도 43%의 정제액을 얻을 수 있었다.

<55> 따라서, 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법을 사용하면, 예비 정제 단계에서도 배양여과액으로부터 일정 수준 이상의 높은 순도를 지닌 테이코플라닌 A₂ 예비정제액을 얻을 수 있음을 알 수 있다.

<56> [실시예 2] 합성흡착제 Lewatit VP OC 1064와 카탈리틱 수지 TRILITE SPC 400LH를 이용한 테이코플라닌 A₂의 예비정제

<57> 합성흡착제 Lewatit VP OC 1064와 카탈리틱 수지 TRILITE SPC 400LH를 이용하여 테이코플라닌 A₂를 예비정제하였다.

<58> 테이코플라닌을 정제할 시료로, 약 0.8g의 테이코플라닌 A₂가 함유된 pH 7의 배양여과액 1ℓ를 준비하였다.

- <59> 1차 예비정제를 위해, 직경 4cm, 길이 12cm의 크로마토그래피 컬럼에 합성흡착제 Lewatit VP OC 1064(Bayer co.) 150ml를 충전시키고, 상기 여과배양액을 2.5ml/min의 유속으로 컬럼에 걸어주었다.
- <60> 10% 아세톤이 함유된 증류수 150ml를 사용하여 컬럼을 세척한 후, 50%의 아세톤을 함유하는 증류수를 사용하여 용출시켰다. 상기 과정에서 사용된 컬럼은 1M 가성소다용액 200ml를 사용하여 재생시키고 이어 증류수 400ml로 세척하였다.
- <61> 상기 과정에 의해 얻은 1차 예비정제액에 대해 HPLC를 수행하여 그 순도를 측정한 결과, 0.75g의 테이코플라닌 A₂가 함유된 HPLC 순도 29%의 정제액을 얻을 수 있었다.
- <62> 이후 2차 예비정제를 위해, 상기 테이코플라닌 1차 정제액에 대해 약 0.6g의 테이코플라닌 A₂가 50ml의 용액에 함유되도록 시료액을 준비하였다.
- <63> 직경 4cm, 길이 12cm의 크로마토그래피 컬럼에 카탈리틱 수지 TRILITE SPC 400LH(Samyang co.) 100ml를 충전시켰다. 상기 컬럼을 가성소다로 세척한 후 묽은 염산으로 다시 한번 세척하여 수지를 평형시키고, 증류수로 세척하여 얻는 용출액의 pH가 5.87임을 확인하였다.
- <64> 상기 시료액을 1.6ml/min의 유속으로 컬럼에 걸어 주었다. 실온에서 증류수로 세척한 후, 가성소다로 pH 12가 되도록 조절된 증류수를 사용하여 용출시켰다. 상기 과정에서 사용된 컬럼은 1M 가성소다용액 150ml를 사용하여 재생시키고 이어 증류수 100ml로 세척한 후, 0.5M 염산용액 150ml으로 세척하고 다시 증류수 200ml로 세척하였다.
- <65> 상기 과정에 의해 얻은 2차 정제액에 대해 HPLC를 수행하여 그 순도를 측정한 결과, 0.56g의 테이코플라닌 A₂가 함유된 HPLC 순도 48%의 정제액을 얻을 수 있었다.

- <66> 상기 실시예 1과 실시예 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법에서는 예비정제단계까지만 거쳐도 어느 정도 높은 순도의 테이코플라닌 A₂ 정제액을 얻을 수 있음을 알 수 있다.
- <67> [실시예 3] 합성 흡착제 DIAION HP2MG, 킬레이트 수지 DIAION CR11 및 KP-C18-HS 역상 수지인 FLASH 75M 카트리지를 이용한 고순도의 테이코플라닌 A₂ 정제액의 수득
- <68> 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법을 이용하여 고순도의 테이코플라닌 A₂ 정제액을 수득하였다
- <69> 테이코플라닌을 정제할 시료로 25.3g의 테이코플라닌이 함유된 pH 7의 배양여과액 21 l 를 준비하였다.
- <70> 1차 예비정제를 위해, 직경 16cm, 길이 40cm의 크로마토그래피 컬럼에 합성 흡착제 DIAION HP2MG(Mitsubishi Chemical co.) 8 l 를 충전시키고, 상기 여과배양액을 133ml/min의 유속으로 컬럼에 걸어주었다.
- <71> 10% 아세톤이 함유된 증류수 8 l 를 사용하여 컬럼을 세척한 후, 50%의 아세톤을 함유하는 증류수를 사용하여 용출시켰다. 상기 과정에서 사용된 컬럼은 1M 가성소다용액 12 l 를 사용하여 재생시키고 이어 증류수 16 l 로 세척하였다.
- <72> 상기 과정에 의해 얻은 1차 예비정제액에 대해 HPLC를 수행하여 그 순도를 측정한 결과, 24g의 테이코플라닌 A₂가 함유된 HPLC 순도 28%의 정제액을 얻을 수 있었다.

- <73> 이후 2차 예비정제를 위해, 상기 1차 예비정제액에 대해 약 2.3g의 테이코플라닌 A₂가 370ml의 용액에 함유되도록 시료액을 준비하였다.
- <74> 직경 4cm, 길이 12cm의 크로마토그래피 컬럼에 킬레이트 수지 DIAION CR11(Mitsubishi Chemical co.) 100ml을 충전시켰다. 상기 컬럼을 가성소다로 세척한 후 초산으로 다시 한번 세척하여 수지를 평형시키고, 증류수로 세척하여 얻는 용출액의 pH가 6.49임을 확인하였다.
- <75> 상기 시료액을 1.6ml/min의 유속으로 컬럼에 걸어 주었다. 실온에서 증류수로 세척한 후, 가성소다로 pH 12가 되도록 조절된 증류수를 사용하여 용출시켰다. 상기 과정에서 사용된 컬럼은 1M 가성소다용액 150ml를 사용하여 재생시키고 이어 증류수 100ml로 세척한 후, 1M 초산용액 150ml로 세척하고 다시 증류수 200ml로 세척하였다.
- <76> 상기 과정에 의해 얻은 2차 예비정제액에 대해 HPLC를 수행하여 그 순도를 측정한 결과, 2.18g의 테이코플라닌 A₂가 함유된 HPLC 순도 52.6%의 정제액을 얻을 수 있었다.
- <77> 이후 최종정제를 위해, 상기 2차 예비정제액에 대해 이후의 정제 단계에 사용하기 위해 약 0.7g의 테이코플라닌 A₂가 10ml의 용액에 함유되도록 시료액을 준비하였다.
- <78> KP-C18-HS 역상 수지인 FLASH 75M 카트리지(Biotage co.)에 상기 시료액을 100ml/min의 유속으로 걸어 주었다. 실온에서 컬럼을 증류수로 세척한 후, 아세트니트릴이 27% 함유된 증류수를 사용하여 용출시켰다. 상기 과정에서 사용된 컬럼은 90% 메탄올 900ml로 재생시키고 이어 증류수 1000ml로 세척하였다.
- <79> 상기 과정에 의해 얻은 정제액에 대해 HPLC를 수행하여 그 순도를 측정한 결과, 0.59g의 테이코플라닌 A₂가 함유된 HPLC 순도 95.2%의 최종정제액을 얻을 수 있었다.

<80> 따라서, 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법에서는 유기용매를 과량 사용하지 않고도, 그리고 비교적 간단한 공정을 통해서도 고순도의 테이코플라닌 A₂ 정제액을 얻을 수 있음을 알 수 있다.

<81> [실시예 4] 합성 흡착제 DIAION HP2MG, 양이온교환수지 PUROLITE C145 및 역상 수지 SK-GEL ODS S-15/30를 이용한 고순도 테이코플라닌 A₂ 정제액 및 그 분말의 수득

<82> 합성 흡착제 DIAION HP2MG, 양이온교환수지 PUROLITE C145 및 역상 수지 SK-GEL ODS S-15/30를 이용하여 고순도 테이코플라닌 A₂ 정제액 및 그 분말을 수득하였다.

<83> 1차 예비정제는 상기 실시예 3와 같이, 합성 흡착제 DIAION HP2MG를 사용하여 수행하였다. 이후 2차 예비정제를 위해, 1차 예비정제액에 대해 약 1.15g의 테이코플라닌 A₂가 190ml의 용액에 함유되도록 시료액을 준비하였다.

<84> 직경 4cm, 길이 12cm의 크로마토그래피 컬럼에 8% 가교도를 갖는 양이온교환수지 PUROLITE C145(Purolite co.) 100ml를 충전시켰다. 상기 컬럼을 가성소다로 세척한 후 초산으로 다시 한번 세척하여 수지를 평형시키고, 증류수로 세척하여 얻는 용출액의 pH가 5.55임을 확인하였다.

<85> 상기 시료액을 1.6ml/min의 유속으로 컬럼에 걸어 주었다. 실온에서 증류수로 세척한 후, 가성소다로 pH 12가 되도록 조절된 증류수를 사용하여 용출시켰다. 상기 과정에서 사용된 컬럼은 1M 가성소다용액 150ml를 사용하여 재생시키고 이어 증류수 100ml로 세척한 후, 1M 초산용액 150ml으로 세척하고 다시 증류수 200ml로 세척하였다.

- <86> 상기 과정에 의해 얻은 2차 예비정제액에 대해 HPLC를 수행하여 그 순도를 측정한 결과, 1.11g의 테이코플라닌 A₂가 함유된 HPLC 순도 48.7%의 정제액을 얻을 수 있었다.
- <87> 이후 최종정제를 위해, 상기 2차 예비정제액에 대해 약 1.11g의 테이코플라닌 A₂가 11ml의 용액에 함유되도록 시료액을 준비하였다.
- <88> NovaPrep 200(Merck co.)의 분취 HPLC의 컬럼에 SK-GEL ODS S-15/30(Soken co.) 200g을 충전시켰다. 상기 시료액을 50ml/min의 유속으로 컬럼에 걸어 주었다. 실온에서 증류수로 세척한 후, 아세토니트릴이 23%의 농도로 함유된 증류수를 사용하여 용출시켰다. 상기 과정에서 사용된 컬럼은 90% 메탄올 300ml로 재생시키고 이어 증류수 500ml로 세척하였다.
- <89> 상기 과정에 의해 얻은 최종정제액에 대해 HPLC를 수행하여 그 순도를 측정한 결과, 0.9g의 테이코플라닌 A₂가 함유된 HPLC 순도 95.5%의 정제액을 얻을 수 있었다.
- <90> 상기 고순도의 테이코플라닌 A₂ 정제액으로부터 분말 형태의 테이코플라닌 A₂를 수득하기 위해, 상기 정제액에 대해 약 0.9g의 테이코플라닌 A₂가 함유된 시료액을 준비하였다.
- <91> 직경 4cm, 길이 12cm의 크로마토그래피 컬럼에 DIAION HP2MG(Mitsubishi Chemical co.) 100ml를 충전하였다. 상기 시료액을 실온에서 1.6ml/min의 유속으로 컬럼에 걸어주었다. 이후 실온에서 컬럼을 증류수로 세척한 후, 아세토니트릴이 60% 함유된 증류수를 사용하여 용출시켰다. 상기 과정에서 사용된 컬럼은 증류수 300ml로 세척하였다.
- <92> 상기 과정을 통해 얻은 용출액을 진공 농축하여 아세토니트릴을 제거시킨 후, 동결 건조하여 테이코플라닌 A₂ 분말을 수득하였다



- <93> [실시예 5] 합성 흡착제 DIAION HP2MG, 킬레이트 수지 DIAION CR11 및 역상 수지 SHISEIDO DMS DM 1020를 이용한 고순도 테이코플라닌 A₂ 정제액 및 그 분말의 수득
- <94> 합성 흡착제 DIAION HP2MG, 킬레이트 수지 DIAION CR11 및 역상 수지 SHISEIDO DMS DM 1020를 이용하여 고순도 테이코플라닌 A₂ 정제액 및 그 분말을 수득하였다.
- <95> 1차 예비정제는 상기 실시예 3와 같이, 합성 흡착제 DIAION HP2MG를 사용하여 수행하였으며, 2차 예비정제도 상기 실시예 3와 같이 킬레이트 수지 DIAION CR11을 사용하여 수행하였다. 이후 최종정제를 위해, 2차 예비정제액에 대해 약 11g의 테이코플라닌 A₂가 함유된 시료액을 준비하였다.
- <96> 직경 4.8cm, 길이 80cm의 크로마토그래피 컬럼에 SHISEIDO DMS DM 1020(100-200mesh, Shiseido Fine Chemical co.) 610ml를 충전하였다. 상기 시료액을 실온에서 5.1ml/min의 유속으로 컬럼에 걸어주었다. 이후 실온에서 컬럼을 증류수로 세척한 후, 아세토니트릴이 25% 함유된 증류수를 사용하여 용출시켰다. 상기 과정에서 사용된 컬럼은 90% 메탄올 1200ml로 재생시키고 이어 증류수 1800ml로 세척하였다.
- <97> 상기 과정에 의해 얻은 용출액에 대해 HPLC를 수행하여 그 순도를 측정한 결과, 9g의 테이코플라닌 A₂가 함유된 HPLC 순도 96.5%의 최종 용출액을 얻을 수 있었다.
- <98> 상기 고순도의 테이코플라닌 A₂ 정제액으로부터 분말 형태의 테이코플라닌 A₂를 수득하기 위해, 상기 정제액에 대해 약 7g의 테이코플라닌 A₂가 함유된 시료액을 준비하였다.



<99> 직경 4cm, 길이 12cm의 크로마토그래피 컬럼에 SHISEIDO DMS DM 1020(100-200mesh, Shiseido Fine Chemical co.) 100ml를 충전하였다. 상기 시료액을 실온에서 0.8ml/min의 유속으로 컬럼에 걸어주었다. 이후 실온에서 컬럼을 증류수로 세척한 후, 아세톤이 70%로 함유된 증류수를 사용하여 용출시켰다. 상기 과정에서 사용된 컬럼은 증류수 300ml로 세척하였다.

<100> 상기 과정을 통해 얻은 용출액을 진공 농축하여 아세톤을 제거시킨 후, 동결 건조하여 테이코플라닌 A₂ 분말을 수득하였다.

<101> 상기 실시예 4와 실시예 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법은 간단한 동결 건조 과정을 통해 유기용매를 완전히 제거하여 분말 형태의 테이코플라닌 A₂를 회수할 수 있게 함으로써, 유기용매 사용 후 석출시 나타나는 용매잔류에 관한 문제점을 해결함을 알 수 있다.

【발명의 효과】

<102> 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법은 과량의 유기용매를 사용하지 않으면서도, 비교적 간단한 공정을 통해 훨씬 높은 순도의 테이코플라닌 A₂를 수득하게 하는 효과가 있다.

<103> 따라서 본 발명의 테이코플라닌 A₂ 정제 방법은 테이코플라닌 A₂를 산업적으로 대량 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

여과된 균배양 발효액을 합성흡착제로 정제하는 1차 예비정제단계, 상기 1차 예비정제액을 고가교도를 지닌 양이온교환수지, 카탈리틱 수지 또는 킬레이트 수지로 정제하는 2차 예비정제단계, 상기 2차 예비정제액을 역상 수지로 정제하는 최종정제단계 및 분말화단계로 이루어짐을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 1차 예비정제단계에서는 여과된 균배양 발효액의 pH를 pH 4~9의 범위로 조절한 후 합성흡착제에 도입함을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 여과된 균배양 발효액의 pH를 pH 5~7의 범위로 조절함을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 합성흡착제는 고다공성 스티렌계 합성흡착제, 고다공성 스티렌계에 브롬을 화학적으로 조성시킨 합성흡착제, 고다공성 스티렌/다이비닐 중합체, 거대그물모양이 가교화된 중합체, 거대 그물모양이 가교화된 지방족 중합체, 거대그물모양이 가교화된 방향족 중합체, 메타크릴계를 기재로 하는 합성흡착제 및 고다공성 스티렌/다이비닐벤젠 이온교환수지를 기재로 하는 탄소(질)의 합성흡착제 중에서 선택된 하나 이상을 사용함을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

**【청구항 5】**

제 4항에 있어서, 합성흡착제는 DIAION SP207, DIAION SP700, DIAION SP825, DIAION SP850, DIAION HP2MG, AMBERLITE XAD 4, AMBERLITE XAD 7, AMBERLITE XAD 1600T, AMBERSORB 563, AMBERSORB 572, AMBERSORB 600, Lewatit VP OC 1064, Lewatit VP OC 1066 또는 Lewatit EP 63 중에서 선택된 하나 이상을 사용함을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 1차 예비정제단계에서 사용되는 용출액은 pH 10~13의 증류수 또는 아세톤이 함유된 증류수 중 선택된 하나임을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 7】

제 6항에 있어서, 1차 예비정제단계에서 사용되는 용출액은 pH 10.5~12의 증류수임을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 8】

제 7항에 있어서, 1차 예비정제단계에서 사용되는 용출액은 50~80%의 농도로 아세톤이 함유된 증류수임을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 9】

제 1항에 있어서, 2차 예비정제단계에 사용되는 수지는 8% 이상의 고가교도를 지닌 양이온교환수지, 카탈리틱 수지 또는 킬레이트 수지 중 선택된 하나임을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 10】

제 9항에 있어서, 2차 예비정제단계에 사용되는 수지는 고다공성 폴리스티렌/다이비닐 중합체를 기질로 하며 술포네이트 또는 이미노아세테이트를 교환기로 갖는 겔 또는 포로스 타입의 양이온교환수지, 카탈리틱 수지 또는 킬레이트 수지 중에서 선택된 하나임을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 11】

제 10항에 있어서, 2차 예비정제단계에 사용되는 수지는 DIAION SK1B, DIAION PK216, DIAION CR11, DIAION CR20, DIAION UBK555, TRILITE SPC 160H, TRILITE SPC 180H, TRILITE SPC 400LH, AMBERLITE 200C Na, AMBERLITE CG50, AMBERLITE CR1310 Na, AMBERJET 200H, AMBERLYST 131 WET, AMBERLYST 232 WET, Lewatit VP OC 1800, Lewatit VP OC 1812, Lewatit MDS1368 Na, Lewatit K1221, PUROLITE PCR833CA, PUROLITE C145, MFG 210 또는 MFG 250 중에서 선택된 하나임을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 12】

제 11항에 있어서, 2차 예비정제단계에 사용되는 수지는 재생시 가성소다 세척 후 초산 또는 묽은 염산 등의 약산에 의한 세척을 순서대로 수행하여, 컬럼을 증류수로 세척하였을 때 최종 용출액의 pH가 4.5~7.0이 되도록 하여 사용함을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 13】

제 12항에 있어서, 2차 예비정제단계에 사용되는 용출액은 pH 10~13의 증류수임을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 14】

제 13항에 있어서, 2차 예비정제단계에 사용되는 용출액은 pH 10.5~12의 증류수임을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 15】

제 1항에 있어서, 역상 수지는 실리카를 기질로 하여 탄소수 1~18 개를 지닌 비극성 측쇄기를 도입한 것으로, 입자크기가 15~150 μ m인 것을 사용함을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 16】

제 15항에 있어서, 역상 수지는 SK-GEL ODS S-15/30, Flash KP-C18-HS, DAISO GEL 3001A 또는 DMS DM 1020 중에서 선택된 하나임을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 17】

제 16항에 있어서, 최종정제단계에서 사용하는 용출액은 유기용매가 함유된 증류수임을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 18】

제 17항에 있어서, 최종정제단계에서 사용하는 용출액은 20~30%의 농도로 유기용매가 함유된 증류수임을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 19】

제 18항에 있어서, 최종정제단계에서 사용하는 용출액은 23~27%의 농도로 아세톤 또는 아세토니트릴이 함유된 증류수 중 선택된 하나임을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 20】

제 1항에 있어서, 분말화단계에서 사용하는 용출액은 50~80%의 농도로 아세톤 또는 아세토니트릴이 함유된 증류수 중 선택된 하나임을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법

【청구항 21】

제 20항에 있어서, 분말화단계는 용출된 테이코플라닌 A₂를 진공 하에서 농축하여 유기용매를 제거한 후 동결 건조시킴을 특징으로 하는 테이코플라닌 A₂ 정제 방법